

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-346587

(43)Date of publication of application : 18.12.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12N 1/15
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 5/10
C12N 9/04
C12Q 1/00
C12Q 1/32
C12Q 1/54
G01N 33/66
//(C12N 1/21
C12R 1:01)
(C12N 9/04
C12R 1:01)

(21)Application number : 2000-172117

(71)Applicant : HAYADE KOJI

(22)Date of filing : 08.06.2000

(72)Inventor : HAYADE KOJI

(54) GLUCOSE DEHYDROGENASE EXCELLENT IN SUBSTRATE SPECIFICITY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a water-soluble PQQGDH(pyrroloquinolinequinone) (glucose dehydrogenase) having a reactivity to lactose or maltose lower than that to glucose.

SOLUTION: This PQQGDH has an amino acid residue substituted from an amino acid residue corresponding to 167 aspartic acid residue of water-soluble PQQGDH derived from *Acinetobacter calcoaceticus*.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-346587

(P2001-346587A)

(43) 公開日 平成13年12月18日 (2001. 12. 18)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	ページ (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/15	2 G 0 4 5
1/15		1/19	4 B 0 2 4
1/19		1/21	4 B 0 5 0
1/21		9/04	D 4 B 0 6 3
5/10		C 1 2 Q 1/00	B 4 B 0 6 5
審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 11 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-172117 (P2000-172117)

(22) 出願日 平成12年6月8日 (2000. 6. 8)

(71) 出願人 596153357

早出 広司

東京都目黒区南 1-13-16

(72) 発明者 早出 広司

東京都目黒区南 1-13-16

(74) 代理人 100106840

弁理士 森田 耕司 (外 6 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 基質特異性に優れたグルコース脱水素酵素

(57) 【要約】

【課題】 グルコースに対する反応性と比較してラクトースあるいはフルトースに対する反応性が低い水溶性 PQQGDH を提供すること。

【解決手段】 *Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 PQQGDH の 167 番目のアスパラギン酸残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている PQQGDH。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 *Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの167番目のアスパラギン酸残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されているPQQGDH。

【請求項2】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基が他のアミノ酸残基で置換されているPQQGDH。

【請求項3】 前記他のアミノ酸残基がグルタミン酸である。請求項1または2に記載のPQQGDH。

【請求項4】 配列：Ser Gln His Xaa Lys Ser Ser(式中、XaaはAsp以外の任意の天然アミノ酸残基である)を含むPQQGDH。

【請求項5】 XaaがGluである。請求項3に記載のPQQGDH。

【請求項6】 野生型のPQQGDHと比較してグルコースに対する高い選択性を有する。請求項1-5のいずれかに記載のPQQGDH。

【請求項7】 請求項1-6のいずれかに記載のPQQGDHをコードする遺伝子。

【請求項8】 請求項7に記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項9】 請求項7に記載の遺伝子を含む形質転換体。

【請求項10】 請求項7に記載の遺伝子が主染色体に組み込まれている。請求項12に記載の形質転換体。

【請求項11】 請求項9に記載の形質転換体を培養し、菌体から水溶性画分を調製することを含む。水溶性PQQGDHの製造方法。

【請求項12】 請求項1-6のいずれかに記載のPQQGDHを含むグルコースアッセイキット。

【請求項13】 請求項1-6のいずれかに記載のPQQGDHを含むグルコースセンサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はピロロキノリンキノン(PQQ)を補酵素とするグルコース脱水素酵素(GDH)の特定のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型PQQGDHに関する。本発明の改変型PQQGDHは、臨床検査や食品分析などにおけるグルコースの定量に有用である。

【0002】

【従来の技術】 PQQGDHは、ピロロキノリンキノン補酵素とするグルコース脱水素酵素であり、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する。

【0003】 PQQGDHには、膜結合性酵素と水溶性酵素があることが知られている。膜結合性PQQGDHは、分子重約87kDaのシングルサブユニット蛋白質であり、種々のグラム陰性菌において広く見いだされてい

る。例えば、AM. Cleton-Jansen et al., J. Bacteriol. (1990) 172, 6308-6315を参照されたい。一方、水溶性PQQGDHは*Acinetobacter calcoaceticus*のいくつかの株においてその存在が確認されており(Broschi, Biotech. Biochem. (1995), 59(8), 1548-1555)。その構造遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が明らかにされている(Mol. Gen. Genet. (1989), 217: 430-436)。A.*calcoaceticus*由来水溶性PQQGDHは、分子重約50kDaのホモダイマーである。他のPQQ酵素とは蛋白質の一次構造上でのホモロジーがほとんどない。

【0004】 最近、本酵素のX線結晶構造解析の結果が報告され、活性中心をはじめとした本酵素の高次構造が明らかとなった。(A. Oubrie et al., J. Mol. Biol., 289, 319-333(1999); A. Oubrie et al., The EMBO Journal, 18(19) 5187-5194 (1999); A. Oubrie et al., FASEB, 95(21), 11787-11791 (1999))。これらの論文によれば、水溶性PQQGDHは6つのW-モチーフから構成されるβプロペラ蛋白質であることが明かとなった。

【0005】 血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーとして臨床診断上極めて重要な指標である。また、微生物を用いる発酵生産におけるグルコース濃度の定量がプロセスモニタリングにおいて重要な項目となっている。従来、グルコースはグルコースオキシダーゼ(GOD)あるいはグルコース6リン酸脱水素酵素(G6PDH)を用いる酵素法により定量されていた。しかし、GODを用いる方法ではグルコース酸化反応にともない発生する過酸化水素を定量するため、カタラーゼあるいはパーオキシダーゼをアッセイ系に添加する必要があった。またGODを用いるバイオセンサーの開発も進められてきたが、反応が水溶液中の溶存酸素濃度に依存することから高濃度のグルコース試料には適さないこと、あるいは溶存酸素濃度によって測定値に誤差が生じる可能性があった。一方、G6PDHは分光学的手法に基づくグルコース定量に用いられてきたが、反応系に補酵素であるNAD(P)を添加しなければならないという煩雑性があった。そこで、これまでのグルコース酵素定量方法に用いられてきた酵素にかわる新たな酵素としてPQQGDHの応用が注目されている。PQQGDHはグルコースに対して高い酸化活性を有していること、およびPQQGDHは補酵素結合型の酵素であるため電子受容体として酸素を必要としないことから、グルコースセンサーの認識素子をはじめとして、アッセイ分野への応用が期待されている。しかしながらPQQGDHはグルコースに対する選択性が低いことが問題であった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 したがって本発明はグルコースに対する改良された選択性を有する水溶性PQQGDHを提供することを目的とする。本発明は特に、

血中グルコース濃度測定の高感度を増加させるために、グルコースに対する反応性と比較してラクトースあるいはマルトースに対する反応性が低い水溶性PQQGDHを提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は従来の水溶性PQQGDHを改良してそのグルコースに対する選択性を高め、臨床検査や食品分析などに応用できる改変型PQQGDHを開発すべく鋭意研究を行なった結果、水溶性PQQGDHの特定の領域においてアミノ酸変異を導入することにより、グルコースに対する選択性がきわめて高い酵素を得ることに成功した。すなわち、本発明は、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの167番目のアスパラギン酸残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されているPQQGDHを提供する。本発明のPQQGDHは、天然の水溶性PQQGDHと比較してグルコースに対して選択性が向上していることを特徴とする。好ましくは本発明の改変型PQQGDHは、グルコースに対する反応性と比べて、ラクトースあるいはマルトースに対する反応性が野生型より低下している。より好ましくは、グルコースに対する反応性を100%とした場合、ラクトースあるいはマルトースに対する活性が50%以下であり、より好ましくは40%以下であり、さらに好ましくは30%以下である。

【0008】本明細書においてアミノ酸残基または領域に関して用いる場合、「相当する」との用語は、構造上類似するが同一ではない2以上の蛋白質において、あるアミノ酸残基または領域が等価の機能を有することを表す。例えば、*Acinetobacter calcoaceticus* 以外の生物に由来する水溶性PQQGDHにおいて、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第164残基から170残基の領域とアミノ酸配列類似性の高い領域が存在し、かつ蛋白質の二次構造から見て該領域がその蛋白質において同じ役割を果たしていると考えられる場合、該領域は「*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの164残基から170残基の領域に相当する」と言われる。さらに、該領域の第4番目のアミノ酸残基は「*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第167残基に相当する」と言われる。なお、本明細書においては、アミノ酸の位置は、開始メチオニンを1として番号付けする。

【0009】好ましくは、本発明のPQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている。

【0010】また別の観点においては、本発明のPQQGDHは、配列：

Ser Gln His Xaa Lys Ser Ser

(式中、XaaはAsp以外の任意の天然アミノ酸残基である)を含む。

【0011】本発明はまた、上述のPQQGDHをコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクターおよび該遺伝子を含む形質転換体、および本発明のPQQGDHの製造方法、ならびに本発明のPQQGDHを含むグルコースアッセイキットおよびグルコースセンサーを提供する。

【0012】本発明のPQQGDHの酵素蛋白質はグルコースに対して高い選択性を示すため、グルコースの高感度かつ高選択的な測定に応用できる。

【0013】

10 【発明の実施の形態】改変型PQQGDHの構造

水溶性PQQGDHをコードする遺伝子のコーディング領域中にエラーブローンPCR法によりランダムに変異を導入し、アミノ酸残基の変異が導入された水溶性PQQGDHのライブラリーを構築した。これを大腸菌に形質転換し、PQQGDHの活性についてスクリーニングして、100mM濃度のグルコースに対する活性が野生型PQQGDHと同等であるが、100mMのマルトースに対する活性が野生型PQQGDHより低下したPQQGDHを発見する多数のクローンを得た。

20 【0014】これらのクローンの一つについて遺伝子配列を解析したところ、第167番目のAspがGluに置換されていることが判明した。さらにこの残基をグリシン、ヒスチジン、チロシン、アラニン、リジン、アスパラギン、グルタミン、バリン、システイン、セリンあるいはトリプトファン残基に置換したところ、いずれの残基に置換しても野生型水溶性PQQGDHよりもグルコースに対する選択性が向上した変異酵素が得られた。

30 【0015】本発明の改変型PQQGDHにおいては、所望のグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する限り、さらに他のアミノ酸残基の一部が欠失または置換されていてもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が当該技術分野において知られており、例えば、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 1st 版、第2版、1989、Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkに記載されている。

40 【0016】さらに、当業者は、他の細菌に由来する水溶性PQQGDHについても、蛋白質の一次構造を並列して比較すること、あるいは当該酵素の一次構造をもとに予測された二次構造を比較することにより、*Acinetobacter calcoaceticus*由来の水溶性PQQGDHの第167番目のアスパラギン酸に相当する残基を容易に認識することができ、本発明にしたがって、かかるアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換することにより、グルコースに対する選択性が向上した改変型PQQGDHを得ることができる。これらの改変型PQQGDHも本発明の範囲内である。

改変型PQQGDHの製造方法

50 *Acinetobacter calcoaceticus*由来の天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子の配列は配列番号2で規定

される。

【0017】本発明の改変型PQQGDHをコードする遺伝子は、天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子において、所望のアミノ酸残基をコードする塩基配列を、変異すべきアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換することにより構築することができる。

【0018】とのようにして得た変異遺伝子を遺伝子発現用のベクター（例えばプラスミド）に挿入し、これを適当な宿主（例えば大腸菌）に形質転換する。外来性蛋白質を発現させるための多くのベクター・宿主系が当該技術分野において知られており、宿主としては例えば、細菌、酵母、培養細胞などの種々のものを用いることができる。

【0019】ランダム変異を導入する場合には、標的とする領域においてエラーブローンPCR法によりランダムに変異を導入し、該領域に変異が導入された変異水溶性PQQGDH遺伝子ライブラリーを構築する。

【0020】これを大腸菌に形質転換し、PQQGDHのグルコースに対する選択性について各クローンをスクリーニングする。水溶性PQQGDHは大腸菌において発現させたときにペリプラズム空間に分泌されるため、菌体そのものを用いて容易に酵素活性の検定を行うことができる。このライブラリーを色素としてPMS-DCIPを加え、PQQGDHの活性を目視により判定して、100mM濃度のグルコースに対する活性が野生型PQQGDHと同等であるが、100mMのマルトースに対する活性が野生型PQQGDHより低下したPQQGDHを発現するクローンを選択し、遺伝子配列を解析してその変異を確認する。

【0021】上述のようにして得られた、改変型PQQGDHを発現する形質転換体を培養し、培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破壊するか、またはオスモティックショックによりペリプラズム酵素を培地中に放出させる。これを遠心分離し、PQQGDHを含む水溶性画分を得ることができる。あるいは、適当な宿主ベクター系を用いることにより、発現したPQQGDHを培養液中に分泌させることもできる。得られた水溶性画分を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、HPLCなどにより精製することにより、本発明の改変型PQQGDHを調製する。

酵素活性の測定方法

本発明のPQQGDHは、PQQを補酵素として、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する作用を有する。

【0022】酵素活性の測定は、PQQGDHによるグルコースの酸化にともなって還元されるPQQの量を酸化還元色素の呈色反応により定量化することができる。呈色試薬としては、例えば、PMS（フェナジンメトサルフェート）-DCIP（2,6-ジクロロフェノールイ

ンドフェノール）、フェリシアン化カリウム、フェロセンなどを用いることができる。

選択性の評価方法

本発明のPQQGDHのグルコースに対する選択性は、基質として、2-デオキシ-D-グルコース、マンノース、アロース、3-O-メチル-D-グルコース、ガラクトース、キシロース、ラクトースおよびマルトース等の各種の糖を用いて上述のように酵素活性を測定し、グルコースを基質としたときの活性に対する相対活性を調べることにより評価することができる。

グルコースアッセイキット

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う改変型PQQGDHを少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の改変型PQQGDHに加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリアブレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う改変型PQQGDHは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で提供されるが、アポ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

グルコースセンサー

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で検定する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で電極上に固定化するが、アポ酵素の形態で固定化し、PQQを別の画としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の改変型PQQGDHをカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロックする。

【0023】グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、PQQおよびCaCl₂、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型PQQGDHを固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用

いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

【0024】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0025】実施例1

変異PQQGDH遺伝子ライブラリの構築およびスクリーニング

Taq DNAポリメラーゼ (5 U/ μ l)	0.5 μ l
テンプレートDNA	1.0 μ l
フォワードプライマーABF	4.0 μ l
リバースプライマーABR	4.0 μ l
10 \times Taqポリメラーゼバッファー	10.0 μ l
1M β -メルカプトエタノール	1.0 μ l
DMSO	10.0 μ l
5mM MnCl ₂	10.0 μ l
10mM dGTP	2.0 μ l
2mM dATP	2.0 μ l
10mM dCTP	2.0 μ l
10mM dTTP	2.0 μ l
H ₂ O	51.5 μ l

100.0 μ l

得られた変異水溶性PQQGDHのライブラリーを大腸菌に形質転換し、形成された各コロニーをマイクロタイタープレートに移した。コロニーを別のプレートにレプリカし、片方のプレートにはグルコース濃度100mMおよびPMS-DCIPを加え、他方のプレートには100mMマルトースおよびPMS-DCIPを加え、双方のPQQGDHの活性を目視で判定した。2枚のプレートでグルコースの示す活性よりもマルトースに対する活性が大幅に低下したクローンが多数得られた。

【0027】このうち1つのクローンを任意に選び、遺伝子配列を解析したところ、167番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に変異していたことがわかった。

【0028】実施例2

改変型PQQGDH遺伝子の構築

配列番号2に示されるAcinetobacter calcoaceticus由来PQQGDHの構造遺伝子をもとに、配列：

5'-CC TGA CTG ATG GTG TTT TGA TGA AGC-3' (配列番号：4)

のオリゴヌクレオチドターゲットプライマーを合成し、167番目のアスパラギン酸をグリシンに置換した。部位特異的変異はプラスミドpGB2を用いて、図2に示す方法により行った。

【0029】ベクタープラスミドpKF18k (宝酒造(株))にAcinetobacter calcoaceticus 由来PQQG

*プラスミドpGB2は、ベクターpTrc99A (ファルマン社製)のマルチクローニング部位に、Acinetobacter calcoaceticus由来PQQGDHをコードする構造遺伝子を挿入したものである(図1)。このプラスミドをテンプレートとして、エラーブローンPCR法により種々の領域中にランダムに変異を導入した。PCR反応は、表1に示す組成の溶液中で、94℃3分間、次に、94℃3分間、50℃2分間、および72℃2分間を30サイクル、最後に72℃で10分間の条件で行った。

【0026】

【表1】

DHをコードする遺伝子の一部を含むKpn I-Hind III断片を組み込み、これをテンプレートとした。このテンプレート50fmolと宝酒造(株)製Mutan (登録商標)-Express Kmキットに付属のセレクションプライマー5pmol、リン酸化したターゲットプライマー50pmolを全体(20 μ l)の1/10量の同キットのアニーリングバッファーとともに混合し、100℃、3分間の熱処理でプラスミドを変性させ、1本鎖にした。セレクションプライマーはpKF18kのカナマイシン耐性遺伝子上にある二重のアンバー変異を復帰させるためのものである。これを5分間氷上に置き、プライマーをアニーリングさせた。これに3 μ lの同キットエクステンションバッファー、1 μ lのT4 DNAリガーゼ、1 μ lのT4 DNAポリメラーゼおよび5 μ lの滅菌水を加えて相縮鎖を合成した。

【0030】これをDNAのミスマッチ修復能欠損株であるE.coli BMH71-18mutSに形質転換し、一晚振とう培養を行ってプラスミドを増幅させた。

【0031】次に、ここから抽出したプラスミドをE.coli MV1184に形質転換し、そのコロニーからプラスミドを抽出した。そしてこれらのプラスミドについてシーケンスを行い、目的とした変異の導入を確認した。この断片を、プラスミドpGB2上の野生型PQQGDHをコードする遺伝子のKpn I-Hind III断片と入れ

替え、改変型PQQGDHの遺伝子を構築した。

【0032】同様にして、Asp167Ala、Asp167His、Asp167Lys、Asp167Asn、Asp167Gln、Asp167Val、Asp167Tyr、Asp167Cys、Asp167Ser、Asp167Trpの各変異を有する改変型PQQGDHの遺伝子を構築した。

【0033】実施例3

改変型PQQGDHの調製

野生型または改変型PQQGDHをコードする遺伝子を、E. coli用の発現ベクターであるpTrc99A（ファルマン社）のマルチクローニングサイトに挿入し、構築されたプラスミドをE. coli DH5 α 株に形質転換した。これを450mLのL培地（アンピシリン50 μ g/mL、クロラムフェニコール30 μ g/mL含有）で坂口フラスコを用いて37 $^{\circ}$ Cで一晩振とう培養し、1mM CaCl $_2$ 、500 μ M MPQQを含む7LのL培地に接種した。培養開始後約3時間でインプロビルチオガラクトシドを終濃度0.3mMになるように添加し、その後1.5時間培養した。培養液から遠心分離（5000 \times g、10分、4 $^{\circ}$ C）で菌体を回収し、この菌体を0.85% NaCl溶液で2回洗浄した。集菌した菌体をフレンチプレスで破砕し、遠心分離（10000 \times g、15分、4 $^{\circ}$ C）で未破砕の菌体を除去した。上清を超速心分離（150500 \times g（40000r.p.m.）、90分、4 $^{\circ}$ C）し、水溶性画分を得た。これを粗精製酵素標品として以下の実施例において用いた。

【0034】さらに、こうして得た水溶性画分を10mMリン酸緩衝液pH7.0で一晩透析した。透析したサンプルを10mMリン酸緩衝液pH7.0で平衡化した陽イオン交換クロマトグラフィー用充填カラムTSK Gel CM-TOYOPEARL 650M（東ソー株式会社）に吸着させた。このカラムを10mMリン酸緩衝液pH7.0、750mLで洗浄した後、0-0.2M NaClを含む10mMリン酸緩衝液pH7.0を用い、酵素を溶出させた。流速は5mL/minで行った。GDH活性を有する画分を回収し、10mM MO*

* PS-NaOH緩衝液（pH7.0）で一晩透析した。このようにして電気泳動的に均一な改変型PQQGDH蛋白質を得た。これを精製酵素標品として以下の実施例において用いた。

【0035】実施例4

酵素活性の測定

酵素活性の測定は、室温において、10mM MOPS-NaOH緩衝液（pH7.0）中においてPMS（フェナジメトサルフェート）-DCIP（2,6-ジクロロフェノールインドフェノール）を用い、DCIPの600nmの吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素の反応速度とした。このとき、1分間に1 μ molのDCIPが還元される酵素活性を1ユニットとした。また、DCIPのpH7.0におけるモル吸光係数は16.3mM $^{-1}$ とした。

【0036】実施例5

グルコースに対する選択性の評価

各改変型PQQGDHの粗精製酵素標品について基質特異性を調べた。実施例3で得られた野生型および各改変型PQQGDHの粗精製酵素標品をそれぞれ1 μ M MPQQ、1mM CaCl $_2$ 存在下で1時間以上ホロ化した。これを187 μ Lずつ分注し、3 μ Lの活性試薬（6mM DCIP、600mM PMS、10mMリン酸緩衝液pH7.0を含む）および基質を加えた。基質として、それぞれ終濃度100mMとなるように400mMのグルコース、ラクトースおよびマルトースを10 μ L加え、室温で30分間インキュベートして、実施例4と同様に酵素活性を測定した。値はグルコースを基質としたときの活性を100とし、これに対する相対活性で表した。表2に示されるように、本発明の改変型PQQGDHはいずれもラクトースまたはマルトースと比較してグルコースに対する高い選択性を示した。

【0037】

【表2】

	グルコース	ラクトース	マルトース
野生型	100%	54%	58%
Asp167Gly	100%	21%	0%
Asp167His	100%	86%	0%
Asp167Tyr	100%	57%	17%
Asp167Ala	100%	68%	13%
Asp167Glu	100%	32%	10%
Asp167Lys	100%	54%	16%
Asp167Asn	100%	62%	14%
Asp167Gln	100%	59%	53%
Asp167Val	100%	4%	36%
Asp167Cys	100%	57%	22%
Asp167Ser	100%	66%	15%
Asp167Trp	100%	61%	15%

実施例6

精製酵素標品のグルコースに対する親和性の評価

実施例3で得られた野生型PQQGDHおよびAsp167Glu
u改変型PQQGDHの粗精製酵素標品を用いて、実施
例5と同様にそれぞれ1μMPQQ, 1mMCaCl₂,
存在下で1時間以上ホロ化した。これを187μlずつ
分注し、3μlの活性試薬(6mMDCIP48μl,
600mMPMS 8μl, 10mMリン酸緩衝液pH
7.0 16μl)および各濃度のD-グルコース溶液
10μlを加え、実施例4に示す方法により室温で酵素
活性を測定した。基質濃度対酵素活性のプロットから、
KmおよびVmaxを求めた。野生型PQQGDHのグル
コースに対するKm値は約25mMであった。これに
対し、Asp167Glu改変型PQQGDHのKm値は約55
mMであった。また、野生型PQQGDHの活性を100
%としたときのAsp167Gluの比活性は90%以上であ
った。

【0038】実施例7

グルコースのアッセイ

改変型PQQGDHを用いてグルコースをアッセイし
た。Asp167Glu改変型PQQGDHを、1μMPQQ,
1mM CaCl₂,存在下で1時間以上ホロ化し、各種
濃度のグルコースおよび5μMPQQ, 10mM Ca
Cl₂,存在下で酵素活性を測定した。方法は実施例4に
記載の酵素活性の測定法に準じ、DCIPの600nm
の吸光度の変化を指標とした。図3に示されるように、
Asp167Glu改変型PQQGDHを用いて、1-500m *

* Mの範囲でグルコースの定量を行うことができた。

【0039】実施例8

酵素センサーの作製および評価

5ユニットのAsp167Glu改変型PQQGDHにカーボン
ペースト20mgを加えて凍結乾燥させた。これをよく
混合した後、既にカーボンペーストが約40mg充填さ
れたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上
で研磨した。この電極を1%のグルタルアルデヒドを含
む10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で室温で
30分間処理した後、20mMリジンを含む10mM
MOPS緩衝液(pH7.0)中で室温で20分間処理
してグルタルアルデヒドをブロッキングした。この電極
を10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で室温で
1時間以上平衡化させた。電極は4℃で保存した。

【0040】作製した酵素センサーを用いてグルコース
濃度の測定を行った。図4に示されるように、本発明の
改変型PQQGDHを固定化した酵素センサーを用い
て、5mM-100mMの範囲でグルコースの定量を行
うことができる。

【0041】

【発明の効果】改変型PQQGDHはグルコースに対す
る選択性が高いことから、本酵素を用いてアッセイキッ
トあるいは酵素センサーを作成すると、従来の天然型の
PQQGDHを用いた場合に比べ、より高い選択性を得
ることができる。

【0042】

【配列表】

Sequence Listing

<11> Sode, Koji

<12> Glucose Dehydrogenase

<13> 001224

<15> 4

<21> 1

<211> 454

<212> FRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 1

Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn

1 5 10 15

Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu

20 25 30

Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly

35 40 45

Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe

50 55 60

Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu

65 70 75 80

Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile

85 90 95

Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn

(8)

特開2001-346587

13

14

100 105 110
 Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu
 115 120 125
 Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His
 130 135 140
 Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr
 145 150 155 160
 Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn
 165 170 175
 Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr
 180 185 190
 His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile
 195 200 205
 Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr
 210 215 220
 Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys
 225 230 235 240
 Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu
 245 250 255
 Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys
 260 265 270
 Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Ala Asn Lys
 275 280 285
 Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val
 290 295 300
 Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro
 305 310 315 320
 Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro
 325 330 335
 Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser
 340 345 350
 Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu
 355 360 365
 Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile
 370 375 380
 Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro Met
 385 390 395 400
 Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly
 405 410 415
 Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp
 420 425 430
 Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys
 435 440 445
 Phe Thr Tyr Lys Ala Lys
 450

<210> 2

<211> 1612

<212> DNA

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 2

agctacitrtt atqcaacaga gcccttcaga aarctagatt ttaatagatt cgttattcat 60
 cataatcaaa atcatataga gaactcgtac aaacctttra ttaagqrrt aaaaattctc 120
 qnaaaatttt qacaatttat aaqgtgaca catgaataaa catrttrttq ctaaaattgc 180
 rrtattraagc gctgttcaqc taattacact ctcaqctrrt gctgatgttc ccttaactcc 240
 arctcaattt gctaaagcga aatcaagaqa cttgacaaq aaagtattc tatctaattc 300
 aaataagccq catgcttttq tatgggacc agataatcaa arttgrraa ctgaocgaqc 360
 aacagqraaq atctaaagat ttaattcaga gtcggtatgt qraaaaacag rrtttcaagt 420
 accagagatt gtcaatgatg ctgaatggca gaatgtrra ttaqgtttq ccttccatcc 480
 rgartrraaa aataatcctt atactatatar rtaaggtaca ttaaaaaac cgaatctac 540
 aataaagaa rtaccgaacc aaacgattat rctgccttat acctataata aatcaacaga 600
 racgctcgaq aaqccagtcg atttattac aggaattacct tcatcaaaag accatcaqtc 660
 aqgctgcttt gtcattgggc caqatcaaaa qarrttattat acgattggtg accaagggcc 720
 taaccaactt gcttatttgc tcttgcnaa tcaagcaca catatoccaa ctcaacaaag 780
 actgaatggt aaagactatc acactatatar gqraaaagta ctacgctraa arcttgatg 840
 aaqratcca aaqgataatc caagrtttaa cggggtggtt agccatartt atacacttq 900
 acatcgaat ccgcaggtct taqcatcac tccaaatggt aaattattgc agtctgaaca 960
 aqcccaaac rctgacgatg aaattaacct cattgtcaaa ggtggaatt atggttggcc 1020
 gaatgaaca gattataaag ataatggtg ctatgcttat gcaaatatt caqcaqagc 1080
 caataagta attaagatt taqctcaaaa tgaagtaaaa gaqccgcag ggtccctgt 1140
 gacgaagaa rctgaatgga ctggaanaa cttgttcca ccattaaaa cttatatac 1200
 cgttcaagat acctacact ataacatcc aacttggtga gaatgacct acatttgcg 1260
 gcaacaggt gacagtcac ctgcttatgc ctataagggc ggtaaaaag caattactg 1320
 rttggaana acattattggt tccatcttt aaaaatggt gctatttcc gatttaagt 1380
 aaatccact tatacacta ctatgatga cgtgtaccg atgtttaaga gnaacaacc 1440
 rratcgtat gttatgcaa gtcagatgg gaatgttta tatgtatga ctgatactg 1500
 cgaatggtc caaaaagatg atggtcagc acaaatata ttaaaaaacc caqatctct 1560
 catraagtc acctataag ctaagtaata cagctcatt aaaaaaccga tc 1612

<210> 3

<211> 20

<212> FRT

<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

<220>

<221> 4

<22> Xaa is any amino acid residue

<400> 3

Ser Gln His Xaa Lys Ser Ser

1

5

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> primer for point mutation

<400> 4

cctgaatgat ggtgttttga tgaaga

【図面の簡単な説明】

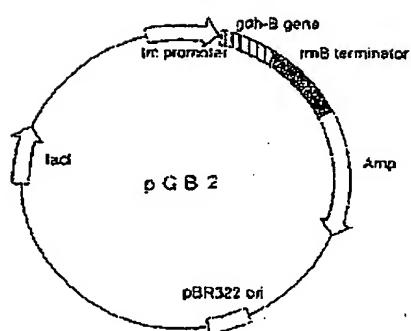
【図1】 図1は、本発明において用いたプラスミド pGB2の構造を示す。

【図2】 図2は、本発明の改変型PQQGDHをコードする突然変異遺伝子を作成する方法を示す。

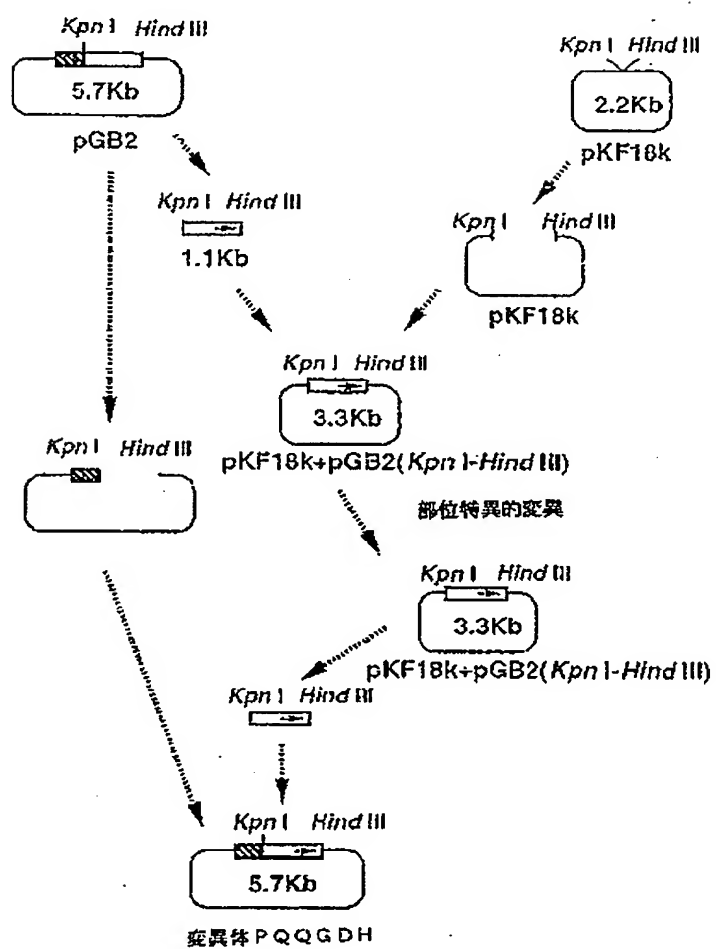
【図3】 図3は、本発明の改変型PQQGDHのs vプロットを示す。

【図4】 図4は、本発明の改変型PQQGDHを用いるグルコースのアッセイを示す。

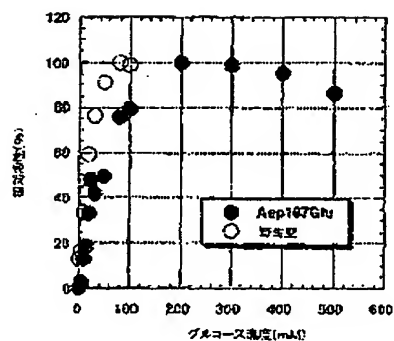
【図1】



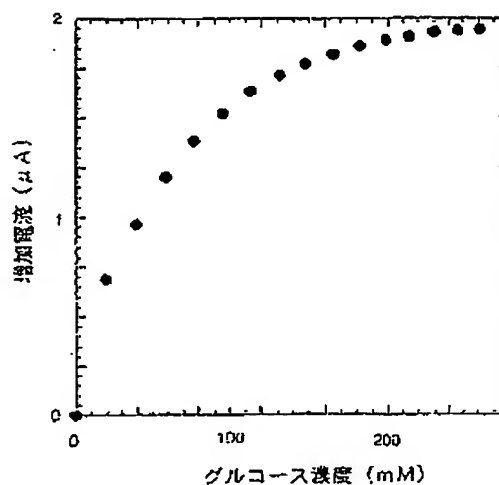
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	付コード (参考)
C 1 2 N	9/04	C 1 2 Q	1/32
C 1 2 Q	1/00		1/54
	1/32	G 0 1 N	33/66
	1/54	(C 1 2 N	1/21
G 0 1 N	33/66	C 1 2 R	1:01)
/(C 1 2 N	1/21	(C 1 2 N	9/04
C 1 2 R	1:01)	C 1 2 R	1:01)
(C 1 2 N	9/04	C 1 2 N	15/00
C 1 2 R	1:01)		5/00
		Z N A A	
		A	

F ターム (参考) 2G045 AA13 BB20 BB60 CA25 CA26
 DA31 FA26 FA29 FB01 FB04
 FB06 FB11 GC10 GC12 GC20
 4B024 AA11 BA08 DA06 EA04 GA11
 HA01
 4B050 CC03 DD02 LL03
 4B053 QA01 QA18 QD02 QD58 QR04
 QR82 QD02 QD28 QD36 QD39
 QX01 QX05
 4B055 AA04Y AA26X AC14 BA02
 CA28 CA46

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.